

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-038183

(43)Date of publication of application : 12.02.2003

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C12M 1/00
C12Q 1/68
G01N 33/53
G01N 33/566
G01N 37/00

(21)Application number : 2001-189686

(71)Applicant : DNA CHIP KENKYUSHO:KK

HATADA IZUHO

(22)Date of filing : 22.06.2001

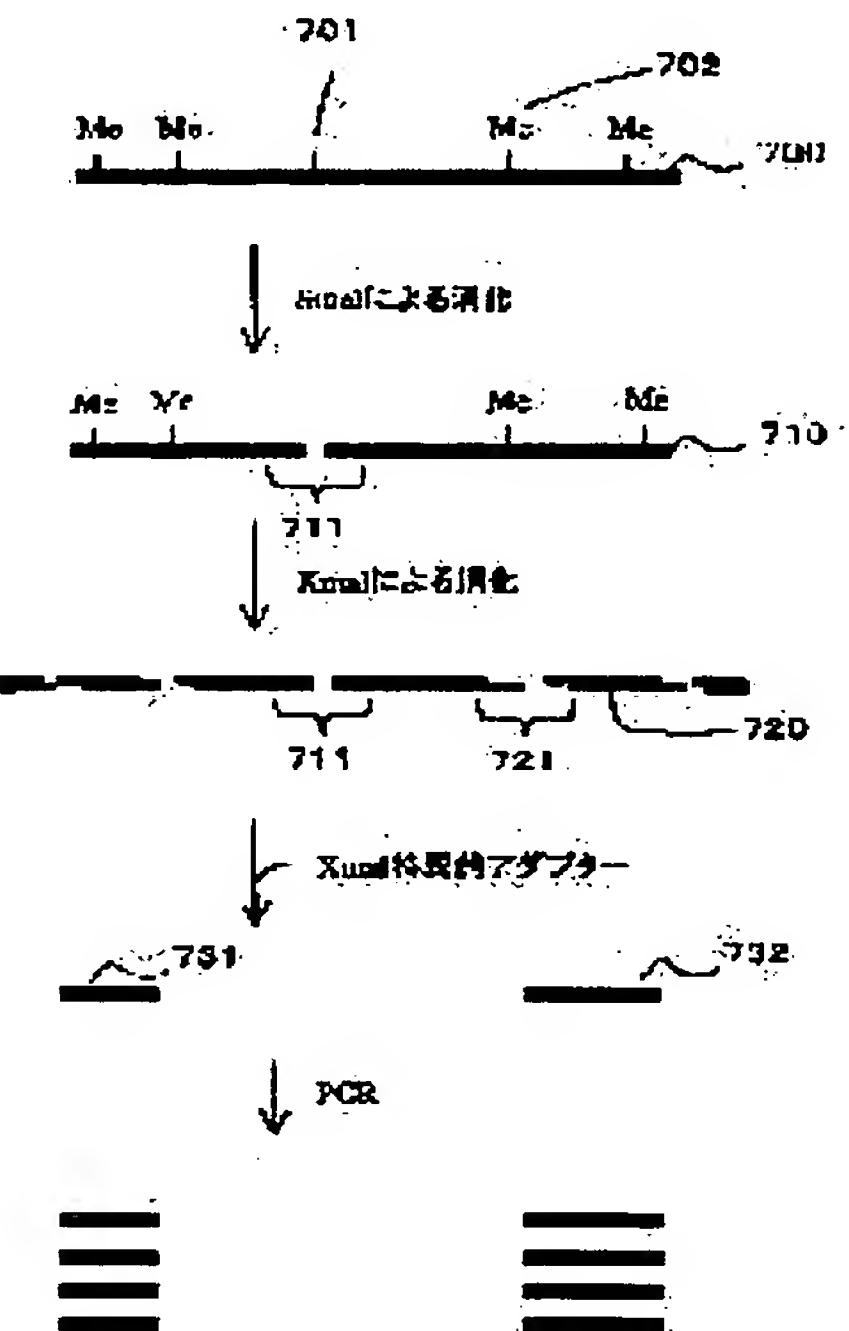
(72)Inventor : HATADA IZUHO
TSUJIMOTO ATSUMI
KATO AZUSA
YURINO YORIKO

(54) BIOCHIP FOR DETECTING METHYLATION OF METHYLATION SITE IN GENOME DNA AND METHOD FOR DETECTING METHYLATION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To cyclopaedically analyze a methylation site in a genome DNA.

SOLUTION: The genome DNA 700 is digested with a methylation-sensitive restriction enzyme SmaI among the methylation-sensitive restriction enzyme SmaI and methylation-insensitive restriction enzyme XmaI cleaving same recognition site and the genome DNA digested with SmaI is digested with XmaI. The DNA fragment 720 whose both ends are sites cleaved with XmaI is specifically amplified and the amplified DNA fragment is detected with a biochip in which the corresponding probe is fixed on a substrate.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-38183

(P2003-38183A)

(43)公開日 平成15年2月12日(2003.2.12)

(51)Int.Cl.⁷

C 12 N 15/09

識別記号

Z NA

F I

テマコード(参考)

C 12 M 1/00

A 4 B 0 2 4

C 12 Q 1/68

A 4 B 0 2 9

G 01 N 33/53

M 4 B 0 6 3

33/566

37/00

1 0 2

37/00

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願2001-189686(P2001-189686)

(22)出願日

平成13年6月22日(2001.6.22)

(71)出願人 501002172

株式会社ディーエヌエイチップ研究所

神奈川県横浜市鶴見区末広町一丁目1番地

43

(71)出願人 501252021

畠田 出穂

群馬県前橋市下小出町2-51-25 サンバ

レス前橋801

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

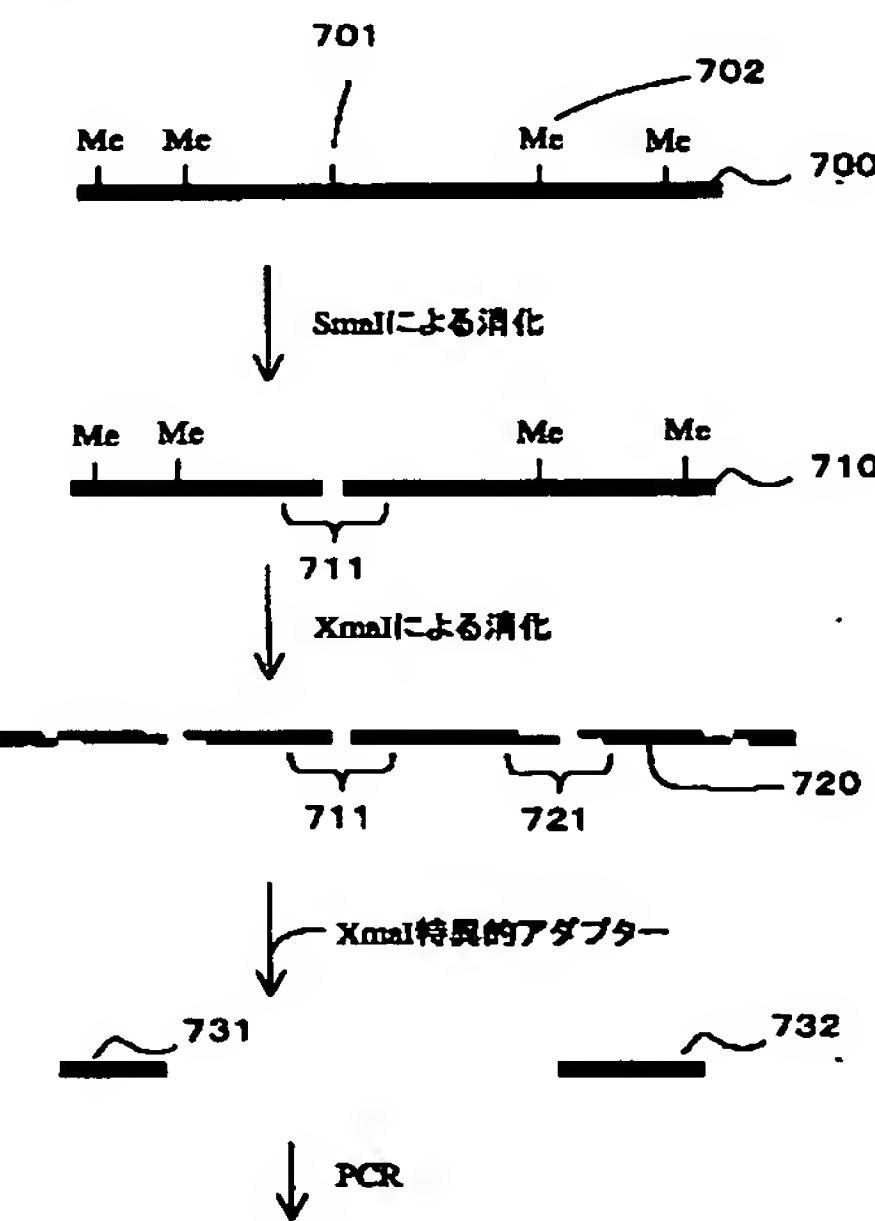
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ゲノムDNA中のメチレーションサイトのメチル化検出用バイオチップ及びメチル化検出方法

(57)【要約】

【課題】 ゲノム中のメチル化部位を網羅的に解析する。

【解決手段】 同じ認識部位を切断するメチル化感受性制限酵素SmaIとメチル化非感受性制限酵素XmaIのうちSmaIでゲノムDNA700を消化し、SmaIで消化したゲノムDNAをXmaIで消化する。両端がXmaIによる切断部であるDNA断片720を特異的に増幅し、増幅したDNA断片を、対応するプローブが基板上に固定されたバイオチップを用いて検出する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 両端にメチレーションサイトをもつゲノムDNA断片の配列の少なくとも一部を含む複数種類の塩基配列をそれぞれ基板上の異なる位置に固定したことを特徴とするゲノムDNA中のメチレーションサイトのメチル化検出用バイオチップ。

【請求項2】 同じ認識部位を有するメチル化感受性制限酵素とメチル化非感受性制限酵素の前記認識部位で両端が切断されたDNA断片の配列の少なくとも一部を含む複数種類の塩基配列をそれぞれ基板上の異なる位置に固定したことを特徴とするゲノムDNA中のメチレーションサイトのメチル化検出用バイオチップ。

【請求項3】 ゲノムDNA中のメチレーションサイトにおけるメチル化の検出に用いるメチル化検出用バイオチップの製造方法であって、

同じ認識部位を切断するメチル化感受性制限酵素が存在するメチル化非感受性制限酵素でゲノムDNAを消化するステップと、

得られたDNA断片をそれぞれ増幅するステップと、
増幅したDNA断片をそれぞれ基板上の異なる位置に固定するステップとを含むことを特徴とするメチル化検出用バイオチップの製造方法。

【請求項4】 ゲノムDNA中のメチル化されたメチレーションサイトを検出する方法において、
ゲノムDNA中で2つのメチル化されている部位に挟まれた塩基配列を特異的に増幅するステップと、
両端がメチレーションサイトであるゲノムDNA断片の配列の少なくとも一部を含む複数種類の塩基配列がそれぞれ基板上の異なる位置に固定されたバイオチップを用いて前記増幅された塩基配列を検出するステップとを含むことを特徴とする方法。

【請求項5】 請求項4記載の方法において、前記2つのメチル化されているメチレーションサイトに挟まれた塩基配列を特異的に増幅するステップは、同じ認識部位を切断するメチル化感受性制限酵素とメチル化非感受性制限酵素、及びいずれかの制限酵素に特異的なアダプターを用いることを特徴とする方法。

【請求項6】 請求項5記載の方法において、前記アダプターは2種のオリゴマーから成ることを特徴とする方法。

【請求項7】 請求項6記載の方法において、前記2種のオリゴマーはリン酸化されていないことを特徴とする方法。

【請求項8】 請求項6記載の方法において、前記2種のオリゴマーは数baseがアニーリングすることを特徴とする方法。

【請求項9】 ゲノムDNA中のメチル化されたメチレーションサイトを検出する方法において、同じ認識部位を切断するメチル化感受性制限酵素とメチル化非感受性制限酵素のうちメチル化感受性制限酵素で

ゲノムDNAを消化するステップと、

前記メチル化感受性制限酵素で消化したゲノムDNAを前記メチル化非感受性制限酵素で消化するステップと、
両端が前記メチル化非感受性制限酵素による切断部であるDNA断片を特異的に増幅するステップと、
前記増幅したDNA断片を、対応するプローブが基板上に固定されたバイオチップを用いて検出するステップとを含むことを特徴とする方法。

【請求項10】 請求項9記載の方法において、前記メチル化感受性制限酵素は平滑末端を生ずる酵素であり、前記メチル化非感受性制限酵素は付着末端を生ずる酵素であり、前記両端が前記メチル化非感受性制限酵素による切断部であるDNA断片を特異的に増幅するステップでは、前記メチル化非感受性制限酵素によって切断された付着末端に特異的に結合するアダプターを用い、当該アダプターに含まれるプライマー部分を利用してPCRを行うことを特徴とする方法。

【請求項11】 請求項9記載の方法において、前記メチル化感受性制限酵素と前記メチル化非感受性制限酵素はいずれも付着末端を生ずる酵素であり、前記メチル化感受性制限酵素でゲノムDNAを消化したのち当該メチル化感受性制限酵素によって切断された付着末端の一本鎖部分を伸長させて平滑末端とするステップを含み、前記両端が前記メチル化非感受性制限酵素による切断部であるDNA断片を特異的に増幅するステップでは、前記メチル化非感受性制限酵素によって切断された付着末端に特異的に結合するアダプターを用い、当該アダプターに含まれるプライマー部分を利用してPCRを行うことを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ゲノムDNA中のメチレーションサイトにおけるメチル化の検出方法及びその方法に用いるバイオチップに関する。

【0002】

【従来の技術】生体内に存在するゲノムはメチル化されることによって発現調整されるため、その異常により先天疾患やがんが起ることが知られている。ゲノム中のある特定部位の増幅及び解析方法はNikolai Lisisynらによって報告されており(Science 259, 946-951(1993))、これを元にある特定部位がメチル化されているかどうかの解析方法がToshikazu Ushijimaらによって考案・報告されている(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Vol. 94, pp. 2284-2289, March 1997)。この方法は、メチル化感受性及び非感受性の制限酵素を用いてゲノムの特定部分を切断し、その後特異的プライマーを用いて、得られた切断断片を増幅して電気泳動などを行い、解析する方法である。また、Minoru Toyotaらによても、メチル化感受性の制限酵素SmaIと非感受性の制限酵素Xba

*ai*を用い、付着末端を生成する*XmaI*に特異的なアダプターを用いて、ある特定部位がメチル化されているかどうかの解析方法が報告されている(Cancer Research 59, 2307-2312(1999))。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかし、従来の検出方法では、ゲノム中の特定のメチレーションサイトだけしか対象にできず、一度にたくさんのメチレーションサイトのメチル化を検出することはできなかった。本発明は、ゲノム中のメチレーションサイトのメチル化を網羅的に解析する手段及び方法を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明は、ゲノム中でメチル化されている部位を特異的に増幅する方法をバイオチップに応用することによって前記目的を達成する。上述の問題点を解決するために、本発明では、ゲノムDNA中で両端にメチル化部位をもつ断片を選択的に増幅し、それをバイオチップやDNAチップ、核酸アレイ(以下、これらを総称してバイオチップという)に用いることを考案した。それによってメチル化部位の網羅的な解析を可能にすることができる。

【0005】本発明によるゲノムDNA中のメチレーションサイトのメチル化検出用バイオチップは、両端にメチレーションサイトをもつゲノムDNA断片の配列の少なくとも一部を含む複数種類の塩基配列をそれぞれ基板上の異なる位置に固定したことを特徴とする。

【0006】本発明によるゲノムDNA中のメチレーションサイトのメチル化検出用バイオチップは、また、同じ認識部位を有するメチル化感受性制限酵素とメチル化非感受性制限酵素の前記認識部位で両端が切断されたDNA断片の配列の少なくとも一部を含む複数種類の塩基配列をそれぞれ基板上の異なる位置に固定したことを特徴とする。

【0007】本発明によるゲノムDNA中のメチレーションサイトにおけるメチル化の検出に用いるメチル化検出用バイオチップの製造方法は、同じ認識部位を切断するメチル化感受性制限酵素が存在するメチル化非感受性制限酵素でゲノムDNAを消化するステップと、得られたDNA断片をそれぞれ増幅するステップと、増幅したDNA断片をそれぞれ基板上の異なる位置に固定するステップとを含むことを特徴とする。

【0008】本発明によるゲノムDNA中のメチル化されたメチレーションサイトを検出する方法は、ゲノムDNA中で2つのメチル化されている部位に挟まれた塩基配列を特異的に増幅するステップと、両端がメチレーションサイトであるゲノムDNA断片の配列の少なくとも一部を含む複数種類の塩基配列がそれぞれ基板上の異なる位置に固定されたバイオチップを用いて前記増幅された塩基配列を検出するステップとを含むことを特徴とする。

【0009】前記2つのメチル化されているメチレーションサイトに挟まれた塩基配列を特異的に増幅するステップは、同じ認識部位を切断するメチル化感受性制限酵素とメチル化非感受性制限酵素、及びいずれかの制限酵素に特異的なアダプターを用いることを特徴とする。アダプターは2種のオリゴマーから成るもの用いることができる。2種のオリゴマーはリン酸化されていないのが好ましい。また、2種のオリゴマーは数baseがアニーリングする。

【0010】本発明によるゲノムDNA中のメチル化されたメチレーションサイトを検出する方法は、同じ認識部位を切断するメチル化感受性制限酵素とメチル化非感受性制限酵素のうちメチル化感受性制限酵素でゲノムDNAを消化するステップと、前記メチル化感受性制限酵素で消化したゲノムDNAを前記メチル化非感受性制限酵素で消化するステップと、両端が前記メチル化非感受性制限酵素による切断部であるDNA断片を特異的に増幅するステップと、前記増幅したDNA断片を、対応するプローブが基板上に固定されたバイオチップを用いて検出するステップとを含むことを特徴とする。

【0011】このとき、メチル化感受性制限酵素として平滑末端を生ずる酵素を用い、メチル化非感受性制限酵素として付着末端を生ずる酵素を用い、両端がメチル化非感受性制限酵素による切断部であるDNA断片を特異的に増幅するステップでは、メチル化非感受性制限酵素によって切断された付着末端に特異的に結合するアダプターを用い、当該アダプターに含まれるプライマー部分を利用してPCRを行うことができる。

【0012】また、メチル化感受性制限酵素とメチル化非感受性制限酵素としていずれも付着末端を生ずる酵素を用い、メチル化感受性制限酵素でゲノムDNAを消化したのち当該メチル化感受性制限酵素によって切断された付着末端の一本鎖部分を伸長させて平滑末端とするステップを含み、両端がメチル化非感受性制限酵素による切断部であるDNA断片を特異的に増幅するステップでは、メチル化非感受性制限酵素によって切断された付着末端に特異的に結合するアダプターを用い、当該アダプターに含まれるプライマー部分を利用してPCRを行うことができる。

【0013】

【発明の実施の形態】以下、図面を参照して本発明の実施の形態を説明する。

(1) プローブ及びバイオチップの作製

図1により、バイオチップ用プローブ及びバイオチップの作成方法について説明する。バイオチップ用プローブは、ゲノムDNA100をメチル化非感受性制限酵素*XmaI*で消化(切断)することによって得る。ゲノムDNA100の*XmaI*認識部位には非メチル化部位101やメチル化部位102がある。メチル化非感受性制限酵素*XmaI*で消化することにより、メチル化の有無に関係なく全ての*Xm*

*Xba*I認識部位が切断される。*Xba*Iの認識部位と切断様式を図2に示した。この消化反応によってできるゲノムDNA断片111～114は付着末端115になっている。

【0014】次に、*Xba*Iによって切断されたゲノムDNA断片111～114の付着末端に対し、図3に示す配列をもつ*Xba*I特異的アダプターを連結反応させる。*Xba*I特異的アダプターは、図4に示すように、オリゴヌクレオチドP1: 5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCCGAC-3' と (c) オリゴヌクレオチドP2: 5'-CCGGGTGGTGA-3' をアニーリングして作成されたものである。言い換えると、*Xba*I特異的アダプターは、1) *Xba*I切断断片に特異的に結合するもので、2) 数ベースがアニーリングしている2本鎖から成り、さらに3) アダプター同士で連結しないようにリン酸化されていないものである。

【0015】次に、図5を用いて*Xba*I特異的アダプターの使用方法を説明する。ここで、500は*Xba*Iに切断されたゲノムDNA、510はリン酸基、520はゲノムDNAとアダプターのオリゴヌクレオチドP1部位の連結部分、530はゲノムDNAとアダプターのオリゴヌクレオチドP2部位の連結部分を示している。

【0016】*Xba*Iに切断されたゲノムDNA500と*Xba*I特異的アダプター511、512とを連結反応させ、*Xba*I特異的アダプターと連結したゲノムDNA540を72°Cで5分間インキュベートし、ゲノムDNA断片に結合した*Xba*I特異的アダプターのオリゴヌクレオチドP2部をはずす。オリゴヌクレオチドP2はリン酸化されていないため、アダプターのオリゴヌクレオチドP2部位は連結部分530で化学的にゲノムDNAと連結できない上、12merと短いので、この条件でオリゴヌクレオチドP2部はゲノムDNAから外れる。一方、ゲノムDNAとアダプターのオリゴヌクレオチドP1連結部分520は*Xba*Iに切断されたゲノムDNA500のリン酸基510を利用してことで、化学的に連結しており、この処理でゲノムDNAから外れることはない。この後、DNA複製反応を行い、オリゴヌクレオチドP1部に相補的なDNAを複製する。こうして作成されたオリゴヌクレオチドP1部を含むDNA断片550は、ゲノムDNA中で、図2に示す配列で両端をはさまれた部分に相当する。このオリゴヌクレオチドP1部を含むDNA断片550は、オリゴヌクレオチドP1配列をプライマーとして増幅することができる。

【0017】図1に戻り、*Xba*Iによって切断されたゲノムDNA断片111～114に対して同様な処理を経て作成したオリゴヌクレオチドP1部を含むDNA断片121～124は、分離した上で、オリゴヌクレオチドP1をプライマーとして各々PCR増幅し、DNAチップのプローブとする。図1では、プローブとなるゲノムDNA断片の増幅をPCRによって行ったが、*Xba*I断片をクローニングすることも可能である。図6を用いてクローニングの説明を行う。

【0018】この場合には、ゲノムDNA600を*Xba*Iで

切断し、切断したゲノムDNA断片610を、*Xba*I制限酵素サイトを持つベクター（例えばプラスミドを用いる場合はpUC18系などで、さらにできればカナマイシン耐性を持つpHSG298、クロラムフェニコール耐性を持つpHSG396など、抗生素耐性などをもち、次に示す培養段階で形質転換した宿主と、そうでない宿主の選択がしやすいものが望ましい）に組み込み、*Xba*I断片を含む組み換え体620を作成した後、これを用いて宿主（たとえば大腸菌DH5α）630などに導入する。この宿主630を適当な選択培地640で培養し、生えてきたシングルコロニー641をピックアップすると、各々異なるDNAが組み込まれたベクターをもつ宿主を選択できることになる。このときコロニーハイブリダイゼーションを行うことで特定のDNAをもつ宿主の選択もできる。

【0019】以上の操作で*Xba*I断片のクローンが得られ、必要ならばサンプルの*Xba*I断片のライブラリを作成することもできる。さらにPCRにはベクターのプライマー-625を用いると、簡単に繰り返しこのDNAを利用できる。このような方法で得られたDNA断片の一部分の塩基配列を、シーケンサーなどで決定し、その配列を合成し、これをプローブとして用いることができる。

【0020】以上のような方法で得られたDNA又はDNAの一部分の配列を合成したものを適当な溶媒に溶解し、プローブとして基板上に固定してバイオチップを作製する。溶媒としては、例えば滅菌蒸留水、TE、SSCなどのバッファー、セルロースなどのポリマー、DMSOなどの有機溶媒もしくはこれらの混合物を用いることができる。

【0021】バイオチップの作製に当たっては、図1に示すように、このDNA溶液を、例えばバイオチップ用の細いピン131でバイオチップの基板130となるメンブランやスライドグラス上にスポットする。基板130はDNAが結合しやすいよう、例えばポリリシンやシランのコーティングが施されている。バイオチップの作製には市販のバイオチップ作製装置を用いることもできる。スポットしたプローブDNAを適当な方法で基板130上に固定した後、ターゲットとのハイブリダイゼーションに用いる。

【0022】(2) 試料(ターゲット)の調製

次に、上述のようにして作製されたバイオチップを用いてメチル化部位を解析すべき、ゲノム試料の調製方法について説明する。ここでは同じ認識部位を切断するメチル化感受性制限酵素と非感受性制限酵素にSmaIと*Xba*Iを用い、*Xba*Iに特異的なアダプターを用いて、ゲノムDNAの中でメチル化されているSmaI、*Xba*I認識部位にはさまれた部分を増幅する方法について説明する。

【0023】図7は、ゲノムDNAに含まれているSmaI、*Xba*I認識部位のうちメチル化されているメチレーションサイトに挟まれた部分を増幅する方法の説明図である。SmaI及び*Xba*Iで切断される非メチル化部位701や、*Xba*Iで切断されるメチル化部位702を含むゲノムDNA7

00を、最初、メチル化感受性制限酵素SmaIで消化する。SmaIの認識部位と切断様式は図8に示す通りであり、この消化反応によってできるSmaI消化ゲノムDNA断片710は平滑末端711になっている。次に、SmaIで消化したSmaI消化済みゲノムDNA710をさらにメチル化非感受性制限酵素XmaIで消化する。この消化反応によってできるXmaI消化ゲノムDNA断片720は付着末端721になっている。

【0024】次に、XmaIに切断されたゲノムDNA断片の付着末端721に対し、図3にて説明したXmaI特異的アダプターを連結反応させる。このとき、このアダプターはSmaIに切断されたゲノムDNA断片の平滑末端711には連結しない。この後、図1及び図5にて説明したように、両端にXmaI特異的アダプターが連結したゲノムDNAを72°Cで5分間インキュベートし、ゲノムDNA断片に結合したXmaI特異的アダプターのオリゴヌクレオチドP2部をはずし、その部分を伸長させる。こうして作成されたオリゴヌクレオチドP1部を含むDNA断片731、732は、ゲノムDNA700中で、図2に示す配列で両端をはさまれ、かつその両端がいずれもメチル化されていた部分に相当する。このオリゴヌクレオチドP1部を含むDNA断片731、732は、オリゴヌクレオチドP1配列をプライマーとして増幅することができ、増幅するときに蛍光物質、例えばCy3やCy5でDNAを標識することでバイオチップ用ターゲットとされる。標識方法には例えばランダムプライミング等の方法が挙げられる。

【0025】図9は、試料調製の際に用いる2種の酵素として、どちらも付着末端を生ずるものを用いた場合の説明図である。まず、ゲノムDNA900を先にメチル化感受性酵素で消化する。こうして得られるメチル化感受性酵素消化ゲノムDNA910は付着末端911を有する。次に生じた付着末端911の一本鎖部分をクレノウフラグメントなどのDNAポリメラーゼを用いて伸長させて平滑末端912とする。

【0026】その後、もう一方のメチル化非感受性酵素で消化すると、得られるメチル化非感受性酵素消化ゲノムDNA920は付着末端921を有する。そこで、後者のメチル化非感受性酵素に特異的なアダプターを連結させ、図1及び図5で説明したのと同様の反応を行い、特異的アダプターに含まれるプライマー部分を利用してPCRを行うと、PCR産物として両端がメチル化しているDNAの断片を得ることができる。

【0027】以下に、本発明の方法によって行った、マウスの新生児とES細胞のゲノムDNAのメチル化部位の検出について説明する。図10は、メチル化部位検出の手順を示す概略説明図である。

【0028】バイオチップ1000には、ポリリシンコート済みのガラスを基板とし、プローブDNAを10サンプル×4回スポットしたもの用いた。バイオチップ1000にスポットした各DNAはマウス新生児のゲノムDNAを

XmaI断片化して増幅したもの、即ち上述のメチル化部位を含むゲノムDNAのXmaI断片であり、メチル化、非メチル化を調べることができる。

【0029】マウスの新生児のゲノムDNA1010とES細胞のゲノムDNA1020を、それぞれ別々にメチル化感受性の制限酵素SmaIで消化する処理1100、メチル化非感受性の制限酵素XmaIで消化する処理1200、XmaI特異的アダプターを連結させる処理1300、標識付けして増幅するPCR、標識反応1400を行った。ターゲットは図7に関して述べたランダムプライマー法を用い、マウスの新生児のゲノムDNA1010をCy3、ES細胞のゲノムDNA1020をCy5で標識した。ハイブリダイゼーション1500の後、バックグラウンドを落とすためにスライドグラスを洗浄して蛍光検出した。

【0030】図11の上段にマウスの新生児のゲノムDNA由来蛍光強度(Cy3)、中段にES細胞のゲノムDNA由来蛍光強度(Cy5)を示す。バイオチップ上のプローブDNAの配置を図11の下段に示す。蛍光が強いスポットは白く見え、蛍光が弱くなると徐々に暗く表示されている。

【0031】この蛍光強度を数値化し、グラフ化したもの図12に示す。グラフの横軸はプローブDNAの番号1～10を、縦軸左側にCy3の蛍光強度に対するCy5の蛍光強度の比=Cy5/Cy3を示し、縦軸右側に分散図上での各スポットの原点からの距離=[(Cy3蛍光強度)²+(Cy5蛍光強度)²]^{1/2}を示している。10サンプル×4回スポットしているうち、原点からの距離は1セットについて、Cy5/Cy3は4セットすべてについて表示している。

【0032】図12から、7番のDNAについて、Cy3の蛍光強度がCy5の蛍光強度よりも2倍程度高いことが見て取れる。これによってこのDNAはマウス新生児のゲノムDNAの方がES細胞のゲノムDNAに比べて2倍程高くメチル化されていることが分かった。また、これは従来法で得られた結果と同様であった。

【0033】

【発明の効果】本発明によると、ゲノム中のメチル化部位を網羅的に解析することが可能になる。

【図面の簡単な説明】

【図1】バイオチップ用プローブ及びバイオチップの作成方法についての説明図。

【図2】XmaIの認識配列と切断様式を示す図。

【図3】XmaI特異的アダプターの配列を示す図。

【図4】XmaI特異的アダプターの作成方法を示す図。

【図5】XmaI特異的アダプターの使用方法を示す図。

【図6】バイオチップ用プローブの作成方法とそのクローニングの説明図。

【図7】ゲノムDNAの中でメチル化されている配列にはさまれた部分を増幅する方法の説明図。

【図8】SmaIの認識配列と切断様式を示す図。

【図9】付着末端を生ずる制限酵素を用いたバイオチッ

用ターゲットの作成方法を示す図。

【図10】メチル化部位検出の手順を示す概略説明図。
【図11】ハイブリダイゼーション蛍光検出画像とプローブDNAの配置を示す図。

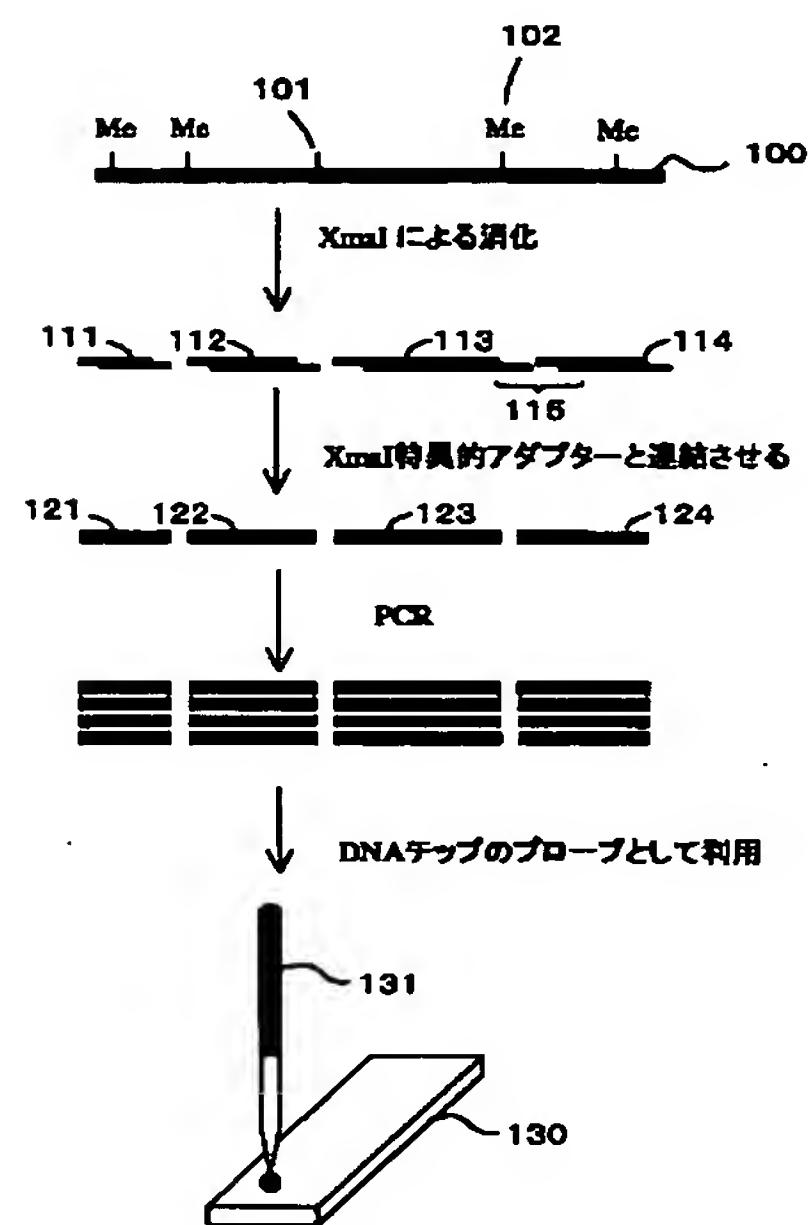
【図12】蛍光強度を数値化してグラフ化した図。

【符号の説明】

100…ゲノムDNA、111…非メチル化部位、112…メチル化部位、111～114…XmaIによって切断されたゲノムDNA断片、115…付着末端、130…基板、131…ピン、500…XmaIに切断されたゲノムDNA、510…リン酸基、511, 512…XmaI特異的アダプター、550…オリゴヌクレオチドP1部を含むDNA断片、600…ゲノムDNA、610…XmaIで切断したゲノムDNA断片、620…XmaI断片を含む組み換え体、6

25…ベクターのプライマー、630…宿主、640…選択培地、641…シングルコロニー、700…ゲノムDNA、701…非メチル化部位、702…メチル化部位、711…平滑末端、721…付着末端、900…ゲノムDNA、910…メチル化感受性酵素消化ゲノムDNA、911…付着末端、912…平滑末端、920…メチル化非感受性酵素消化ゲノムDNA、920…付着末端、931, 932…メチル化非感受性酵素に特異的なアダプター、1000…バイオチップ、1100…メチル化感受性制限酵素SmaIによる消化、1200…メチル化非感受性制限酵素XmaIによる消化、1300…XmaI特異的アダプター連結処理、1400…PCR・標識反応、1500…ハイブリダイゼーション

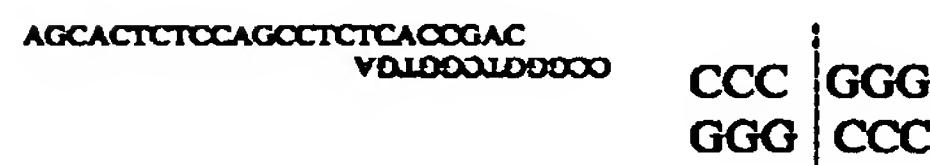
【図1】



【図2】



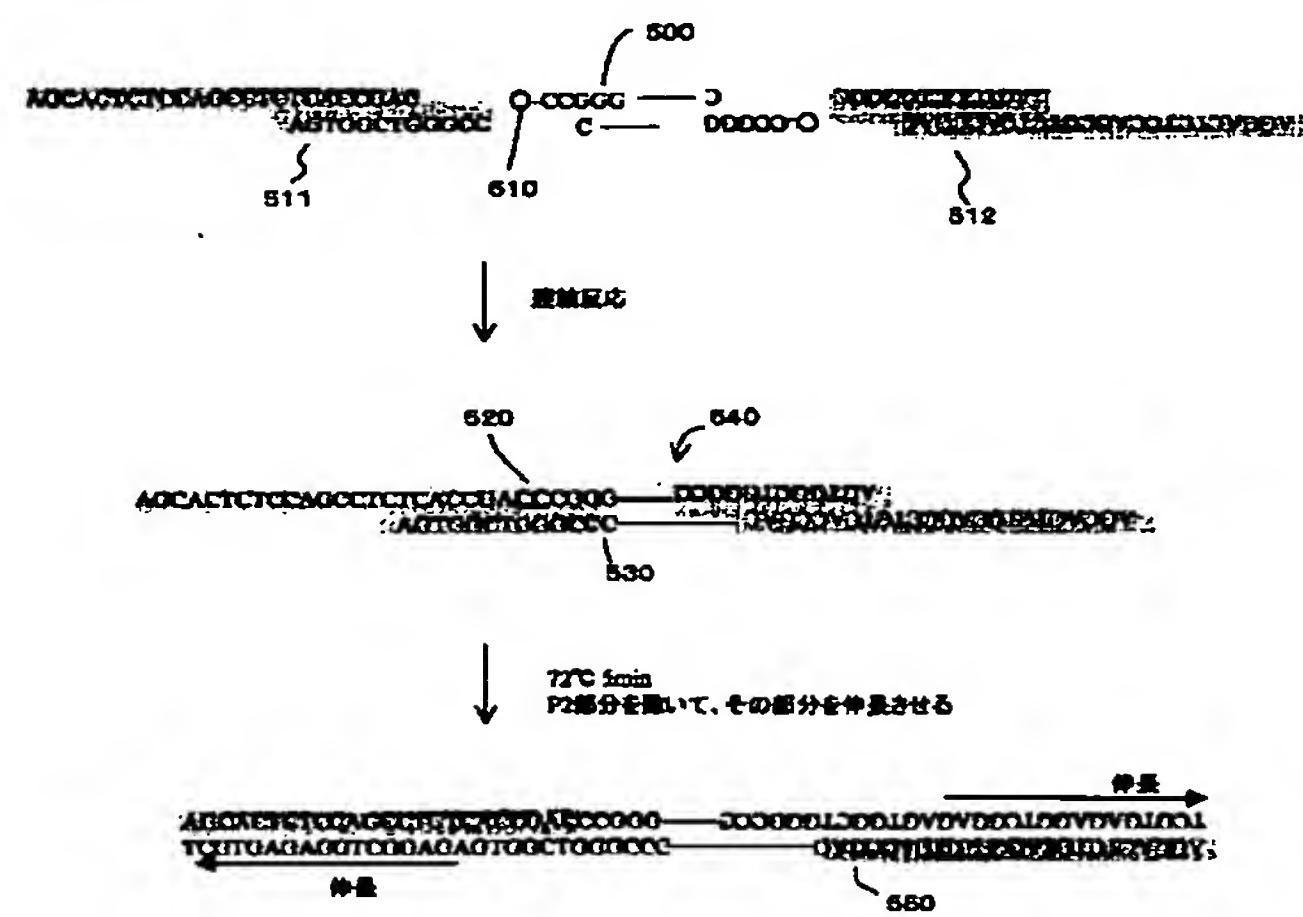
【図3】



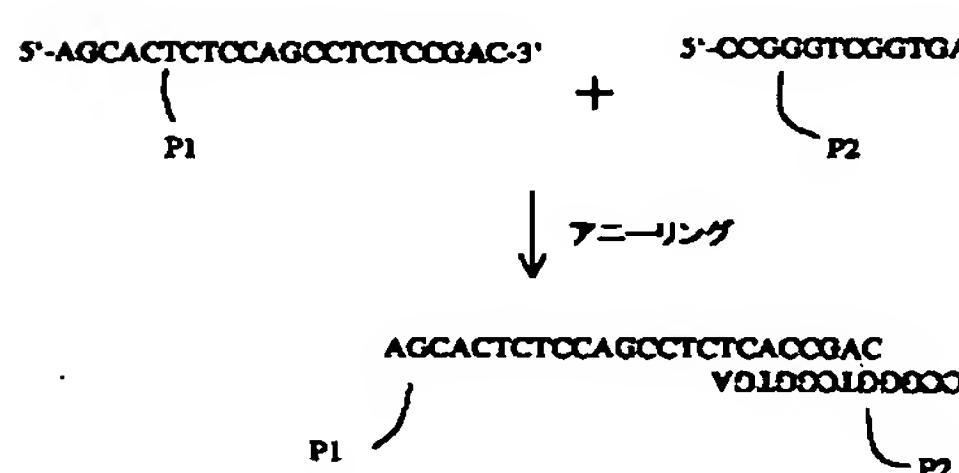
【図8】



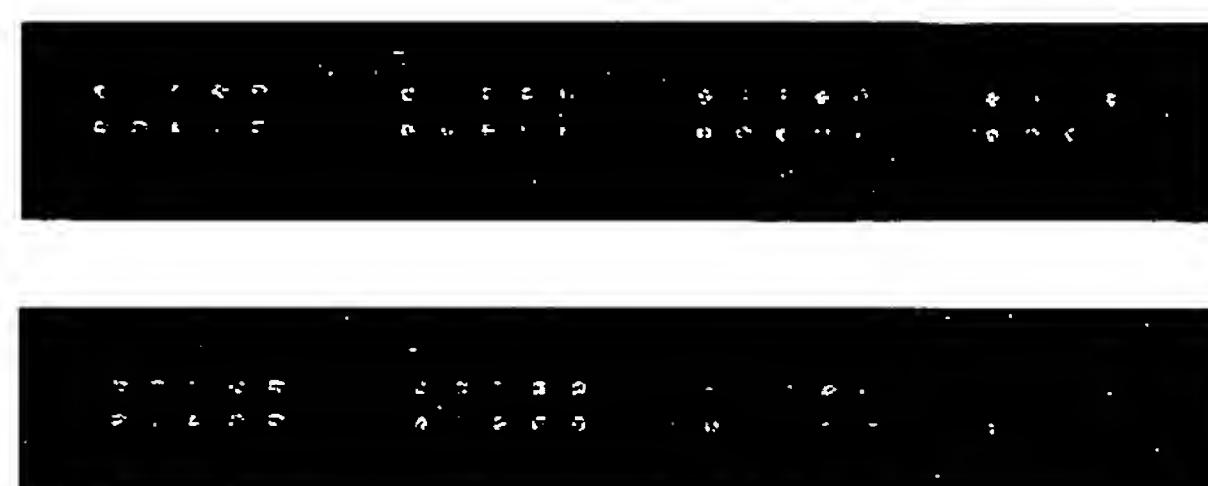
【図5】



【図4】

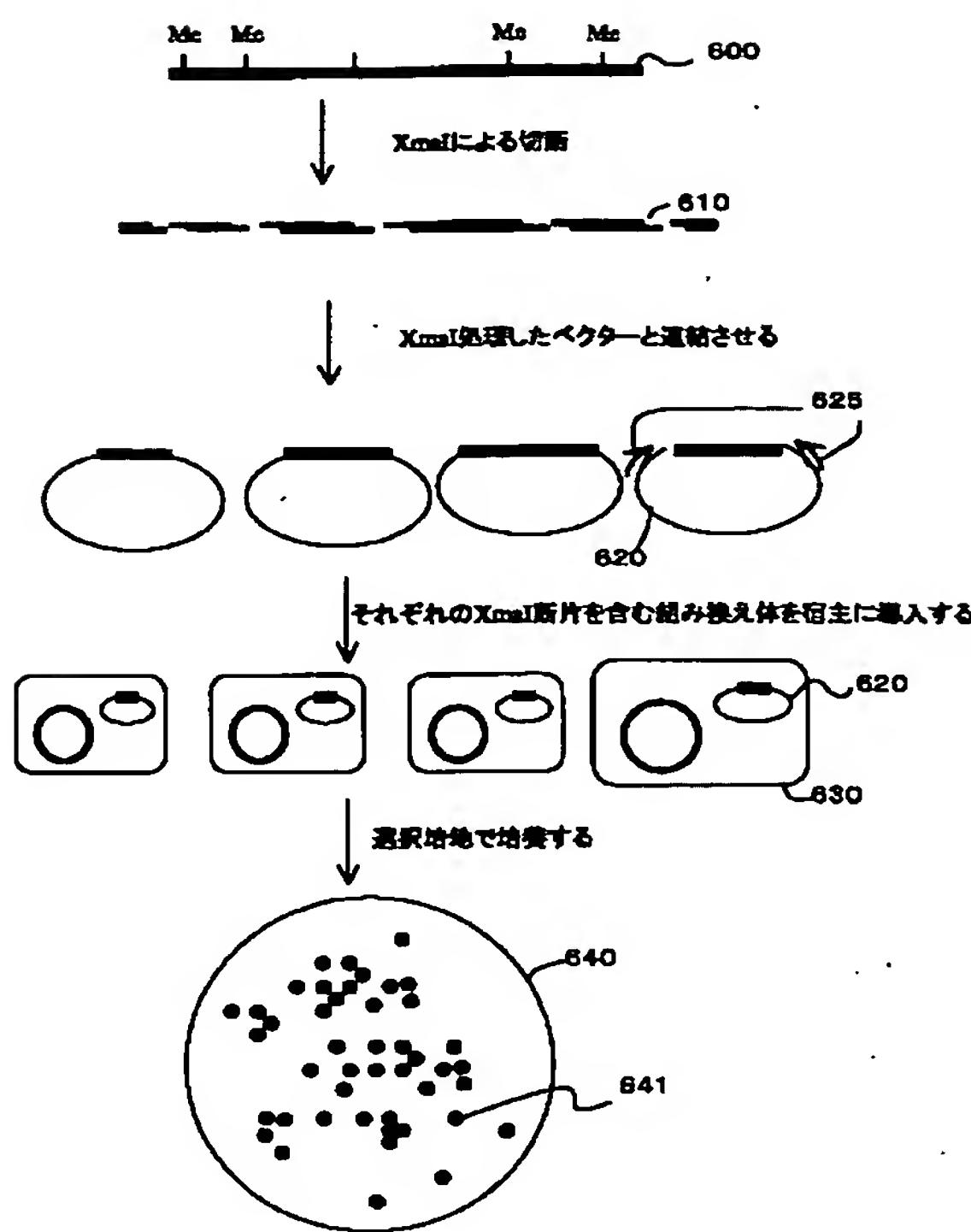


【図11】

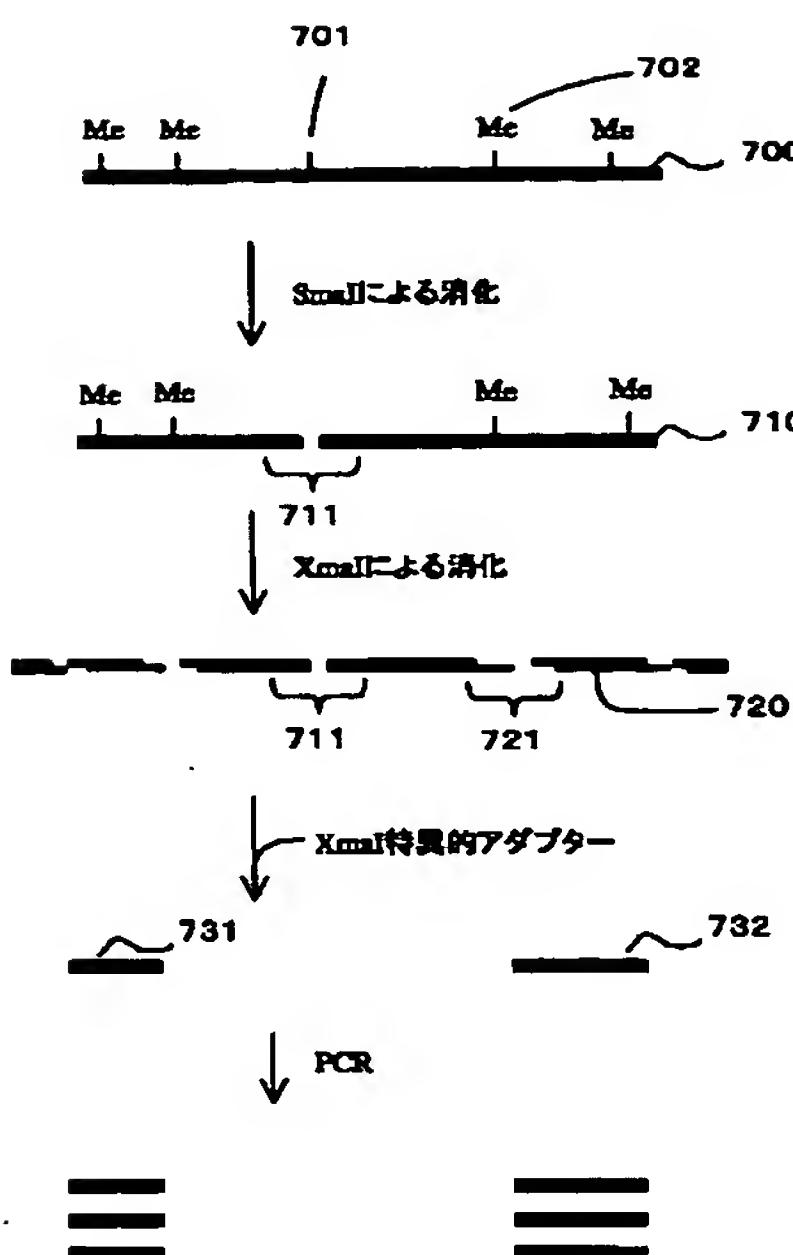


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
-------------------------	-------------------------	-------------------------	-------------------------

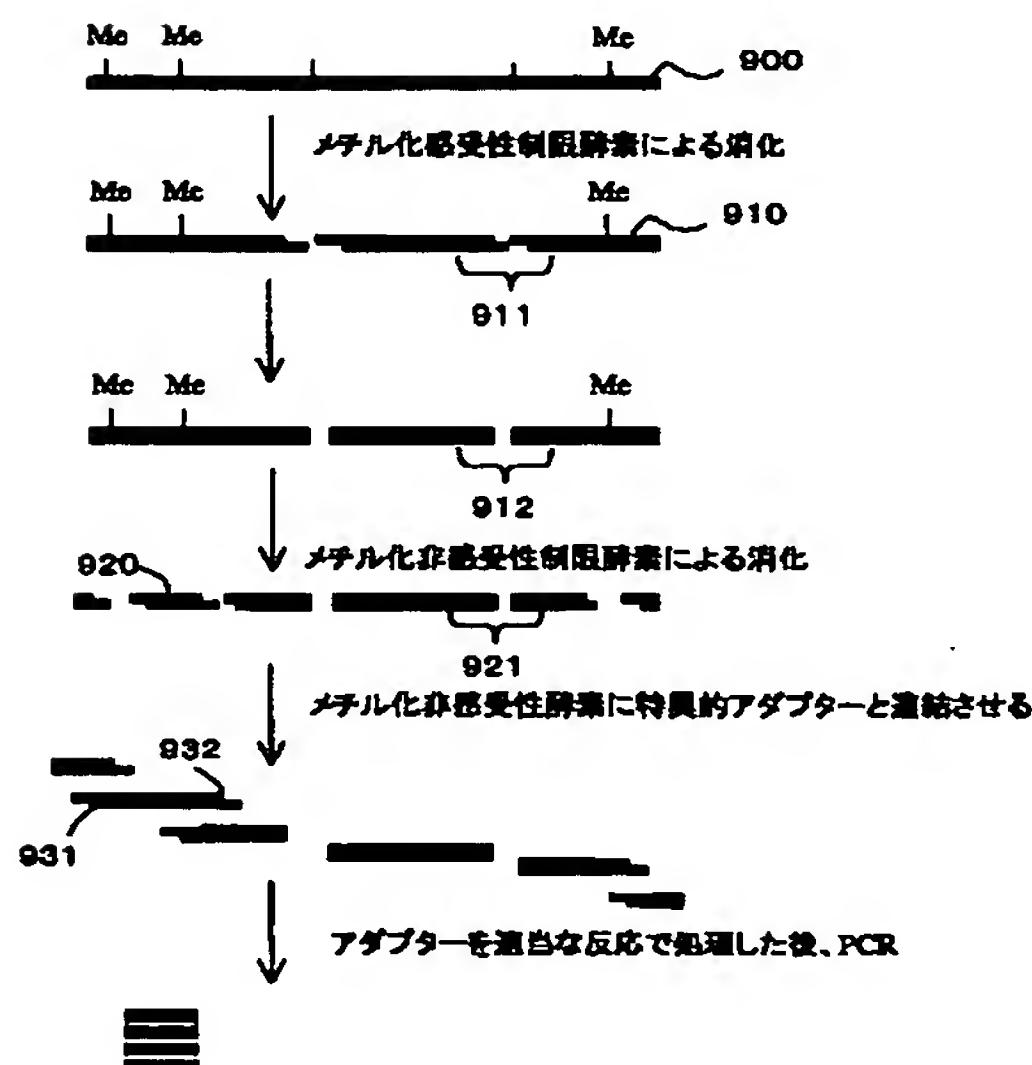
【図6】



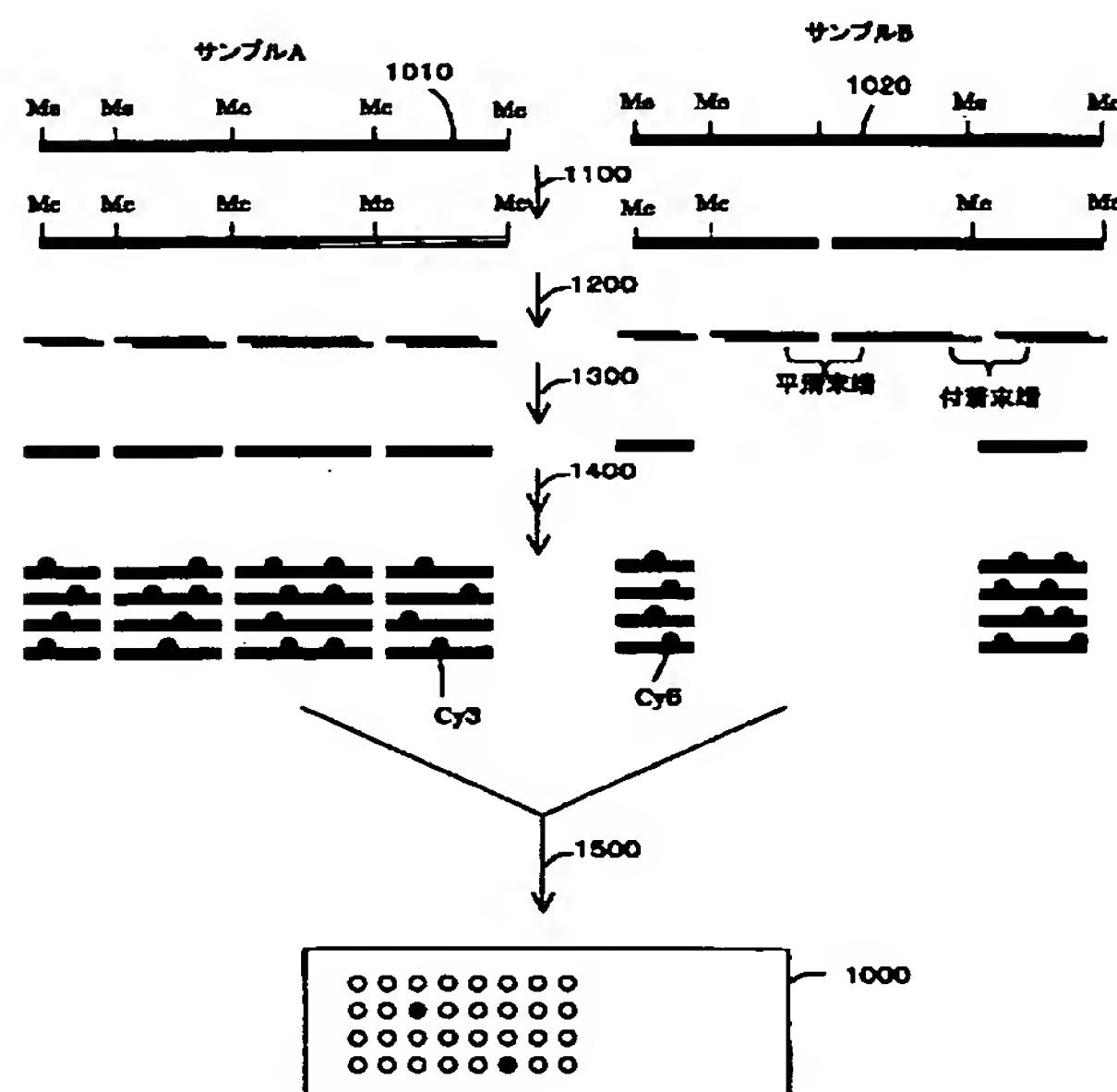
【図7】



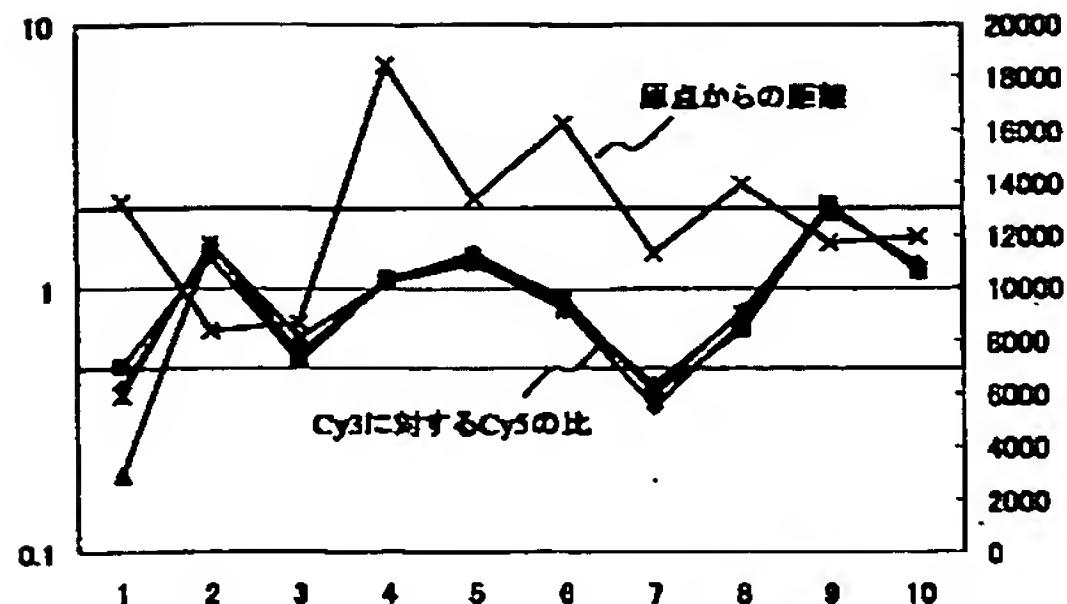
【図9】



【図10】



【図12】



フロントページの続き

(51) Int.C1.7

G O 1 N 33/566
37/00

識別記号

1 0 2

F I

C 1 2 N 15/00

テーマト' (参考)

Z N A A
F

(72) 発明者 畑田 出穂

群馬県前橋市下小出町2-51-25 サンパ
レス前橋801

(72) 発明者 辻本 敦美

神奈川県横浜市保土ヶ谷区神戸町134番地
横浜ビジネスパーク イーストタワー14
階 株式会社ディーエヌエイチップ研究所
内

(72) 発明者 加藤 あづさ

神奈川県横浜市保土ヶ谷区神戸町134番地
横浜ビジネスパーク イーストタワー14
階 株式会社ディーエヌエイチップ研究所
内

(72) 発明者 百合野 以子

神奈川県横浜市保土ヶ谷区神戸町134番地
横浜ビジネスパーク イーストタワー14
階 株式会社ディーエヌエイチップ研究所
内F ターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA09 HA09 HA12
HA204B029 AA07 AA23 BB20 CC03 CC08
FA154B063 QA01 QA13 QQ42 QR14 QR32
QR56 QR62 QR84 QS25 QS34